

VU Research Portal

Novel biosensors for preclinical brain tumor analysis

Niers, J.M.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Niers, J. M. (2011). *Novel biosensors for preclinical brain tumor analysis*. [PhD-Thesis – Research external, graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

SAMENVATTING

Glioblastoma (GBM) is een invasieve en heterogene tumor. Vanwege deze kenmerken, en de onmogelijkheid om GBM compleet uit het brein te opereren, is deze tumor moeilijk te behandelen en is de overlevingskans van GBM-patiënten erg laag. Nieuwe en betere behandelingen zijn hard nodig en om deze te ontwikkelen is het belangrijk om de onderliggende pathologie van GBM beter te begrijpen. Door gebruik te maken van moleculaire beeldvorming kan een beter begrip van deze pathologie worden verkregen. In dit proefschrift hebben we biosensoren ontwikkeld om verscheidene biologische processen te volgen zoals apoptose, NFκB activiteit (een belangrijke transcriptiefactor in kanker) gemeten, tumorcellen in beeld gebracht door gebruik te maken van verschillende beeldvormende modaliteiten en de migratie van tumorcellen geregistreerd. Daarnaast hebben we deze reporters gebruikt om nieuwe therapieën te ontwikkelen voor GBM.

In **Hoofdstuk 2** hebben we een apoptose-biosensor gebouwd door de green fluorescent protein (GFP) te combineren met een caspase-3 splitbare linker, ook wel DEVD genoemd, met daarnaast Gluc met zijn signal sequence (ss). Dit DEVD peptide wordt gespleten zodra caspase-3, het eindproduct van zowel de intrinsieke als de extrinsieke apoptosereactiepaden, actief is. GFP dwingt dit gefuseerde eiwit, inclusief Gluc, om in het cytoplasma te blijven. Wanneer er splijting van het DEVD eiwit plaatsvindt, zal Gluc het secreterende reactiepad betreden, waar het gevouwen wordt in de actieve variant. Vervolgens wordt ssGluc uitgescheiden in het geconditioneerde medium van de cellen *in vitro* waar het gedetecteerd kan worden nadat zijn substraat coelenterazine wordt toegevoegd. Dit reportersysteem is waardevol voor de evaluatie van apoptose-inducerende therapeutische strategieën in tumorcellen en kan zelfs gebruikt worden voor screening van potentiële nieuwe apoptose-inducerende medicijnen. Daarnaast heeft Gluc, om in een actieve vorm gevouwen te worden, zogenoemde “chaperone” eiwitten nodig die zich in het secreterende reactiepad bevinden. Dit reportersysteem zou dus een handig middel kunnen zijn om mutaties of andere verstoringen van deze eiwitten te traceren.

In **Hoofdstuk 3** hebben we een reportersysteem ontworpen dat gebaseerd is op vijf tandem repeats van de NFκB transcriptie-responderende elementen (TRE) en een TATA-box die de expressie van het gesecreteerde Gluc aandrijft. We analyseerden deze reporter *in vitro* in een tijd- en dosisafhankelijke manier, door NFκB te activeren met tumor necrosis factor-alfa (TNFα). De expressie van Gluc was 200 keer hoger door het geactiveerde NFκB. Zo hebben we NFκB ook geremd door sulfasalazine (SSZ) toe te voegen; dit leidde tot een afname van vijf keer van Gluc. Ook hebben we laten zien dat deze NFκB-reporter gevoelig is voor andere biologische veranderingen, zoals angiogenese. Daarnaast hebben we deze reporter gebruikt voor het *in vivo* meten van de NFκB-activiteit, door bloed te screenen op Gluc activiteit.

Deze reporter is uitermate geschikt voor high-throughput screening door *in vitro* het medium van de cellen, en *ex vivo* het bloed, te analyseren voor NFκB activiteit. We hebben deze reporter ook in combinatie met een andere, veel gebruikte, reporter

gebruikt: de gesecreteerde alkaline phosphatase (SEAP). Door deze reporters tegelijkertijd te gebruiken, kunnen twee biologische processen op hetzelfde moment gemeten worden, zoals tumorcelproliferatie en NF κ B-activiteit.

In **Hoofdstuk 4** hebben we de NF κ B-promotor gefuseerd met een therapeutisch gen en de bloedreporter Gluc. Wanneer er NF κ B-activiteit is, zal het therapeutisch gen geactiveerd worden en een toxisch effect bewerkstelligen tegen de tumorcellen, leidend tot celdood. Dit systeem kan versterkt worden door het toedienen van TNF- α en kan ook gebruikt worden voor andere biologische processen, zoals hypoxie en ontsteking.

In **Hoofdstuk 5** hebben we een reporter ontworpen die gebaseerd is op de sterke interactie van biotin (vitamine H) met het kippeneiwit avidin of zijn bacteriële tegenhanger, streptavidin. We hebben een peptide gemaakt dat op het oppervlak van de tumorcel tot expressie komt en waaraan biotin kan binden. Als biotin dan aan dit peptide gebonden is, aan het oppervlak van de cel, kan het een verbinding vormen met toegevoegd streptavidin. Aan streptavidin kan je allerlei beeldvormende middelen binden waardoor de tumorcellen in beeld gebracht kunnen worden.

In **Hoofdstuk 6** hebben we dit werk uitgebreid en Gluc toegevoegd aan dit construct. Hierdoor kunnen (hersens)tumoren in beeld gebracht worden met verschillende modaliteiten, zoals bioluminescentie, fluorescentie, MRI en radionuclidebeeldvorming, zoals SPECT.

In **Hoofdstuk 7** hebben we eerst een infiltratief GBM-diermodel ontwikkeld: primaire tumorcellen, afkomstig van humane tumorsecties, werden als stamcellen gekweekt tot sferoiden. Na injectie van deze cellen in het brein bleek dat zij een invasieve tumor vormen die van de ene hemisfeer naar de andere migreren via het corpus callosum. Dit glijoommodel bleek nuttig om onze hypothese te testen of gemigreerde tumorcellen aangetrokken kunnen worden een SDF-1 α gradiënt. Door gebruik te maken van een AAV-vector konden we met dubbele bioluminescente beeldvorming zowel Fluc als Gluc meten, beide corresponderend voor respectievelijk de tumorcellen en de expressie van SDF-1 α . Het blijkt inderdaad dat een SDF-1 α gradiënt een aantrekkingskracht uitoefent op tumorcellen.

In de Discussie (**Hoofdstuk 8**) beschouwen we kritisch onze hypothesen en resultaten in het licht van de relevante literatuur en staan stil bij mogelijkheden voor toekomstig onderzoek. Hopelijk worden de stappen die in dit proefschrift genomen zijn, vervolgd, zodat dit uiteindelijk zal leiden tot nieuwe en betere behandelingen voor patiënten met een hersentumor.

